فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۶، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۸۲-۷۴ (۱۳۸۹)

اثر غلظت‌های کمتر از حداقل غلظت‌های بازداری رشد سه اسانس گیاهی بر اتصال، حرکت، تولید آلژینات و تشکیل بیوفیلم در پسودوموناس آئروجینوزا

لیلا معین نجف‌آبادی[۱]، پرویز اولیاء[۲*]، سمیه موسوی ندوشن[۱]، ایرج رسولی[۳]، حوریه صادری[۴]، فاطمه سفیدکن[۵] و محمدحسین سالاری[۶]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد
۲*- نویسنده مسئول، استاد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، پست الکترونیک: owlia@shahed.ac.ir
۳- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد
۴- دانشیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد
۵- استاد، بخش تحقیقات گیاهان دارویی و محصولات فرعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور
۶- استاد، گروه باکتری‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۸۸ تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۸۸ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۸۸

چکیده

پسودوموناس آئروجینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) یکی از بیماری‌زاهای فرصت‌طلب و مهم می‌باشد. این باکتری عوامل بیماری‌زایی متعددی تولید می‌کند. هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی اثر غلظت‌های کمتر از حداقل غلظت‌های ممانعت‌کننده از رشد (sub-MIC) بر تولید آلژینات، تشکیل بیوفیلم، سوئیمینگ، توئیچینگ و اتصال در پسودوموناس آئروجینوزا می‌باشد. گیاهان آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.)، مورد (*Myrtus communis* L.) و اکالیپتوس (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.) پس از جمع‌آوری در سایه خشک شدند و به روش تقطیر با آب اسانس‌گیری شدند. مقدار MIC اسانس‌ها به روش ماکروبراث دایلیوشن بدست آمد. بعد اثر غلظت‌های ۰/۵MIC، ۰/۲۵MIC و ۰/۱۲۵MIC اسانس‌های مذکور بر تولید آلژینات، تشکیل بیوفیلم، سوئیمینگ، توئیچینگ و اتصال در پسودوموناس آئروجینوزا استرین M 8821 اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از آزمایش‌ها نشان داد که مقدار MIC برای هر سه اسانس معادل ٦٤µg/mL می‌باشد. همچنین تمام اسانس‌ها در غلظت‌های ۰/۵MIC و ۰/۲۵MIC به‌طور بارز بر تمام فاکتورهای بیماری‌زای مورد آزمایش اثر بارز داشت. به‌طوری که آویشن شیرازی در غلظت ۰/۱۲۵MIC نیز به‌طور بارز اثر خود را نشان داد، اما دو اسانس دیگر در این غلظت اثرهای متفاوتی را نشان دادند. این مطالعه نشان داد که غلظت‌های sub-MIC اسانس‌های آویشن شیرازی، مورد و اکالیپتوس بر تولید آلژینات، تشکیل بیوفیلم، سوئیمینگ، توئیچینگ و اتصال در پسودوموناس آئروجینوزا اثر دارد و این احتمال وجود دارد که بتوان از این گیاهان در درمان عفونت‌های ناشی از پسودوموناس آئروجینوزا استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: تحرک، آلژینات، بیوفیلم، اسانس گیاهی، پسودوموناس آئروجینوزا.

مقدمه

پسودوموناس آئروجینوزا یک بیماری زای فرصت‌طلب است که طیف وسیعی از عفونت‌ها را در بیماران با سیستم ایمنی ضعیف ایجاد می‌کند، ازجمله در بیماران مبتلا به سوختگی، بیماران مبتلا به سرطان، بیماران دریافت‌کننده داروهای سرکوب کننده ایمنی و بیماران مبتلا به

سیستیک فیبروزیس. قدرت بیماری‌زایی این باکتری مربوط به یک‌سری از عوامل بیماری‌زایی است که توسط آن تولید می‌شود، ازجمله این عوامل بیماری زایی می‌توان به اگزوتوکسین‌ها، پروتئازها، همولیزین‌ها و اگزوپلی‌ساکاریدها اشاره کرد (Demko, 1980؛ Slack & Nichols, 1981). برخی از فاکتورهای بیماری‌زا دخیل در اتصال و بقاء باکتری نظیر فیمبریه، تشکیل بیوفیلم، تولید آلژینات و حرکت سبب پیچیده‌شدن بیماری زایی این باکتری می‌شوند (Van Delden & Iglewski, 1998؛ Wilson *et al.*, 2002). مطالعات متعدد نشان داده است که غلظت‌های کمتر از حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد (sub-MIC) برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها (Minimal Inhibitory Concentration) موجب بازدارندگی تولید فاکتورهای فوق در باکتریها شده است. به‌طور مثال این اثر بر روی اتصال، هیدروفوبیسیتی سطوح سلول، تشکیل بیوفیلم و حرکت نشان داده شده است (Wilson *et al.*, 2002؛ Tateda *et al.*, 1993؛ Drago *et al.*, 2001؛ Hassett *et al.*, 1999). سودوموناس آئروجینوزا با داشتن فلاژل قطبی می‌تواند در محیط‌های مایع به راحتی حرکت کند و با استفاده از فیمبریه نوع IV می‌تواند به سطوح مختلف متصل شود. همچنین این باکتری با استفاده از فیمبریه نوع IV می‌تواند بر روی سطوح حرکت از نوع توئیچینگ داشته باشد (Horii *et al.* 2003). مشخص شده که حرکت و اتصال، دو عامل اصلی و اولیه این باکتری در تشکیل بیوفیلم می‌باشند. متعاقب تولید اگزوپلی‌ساکارید از جنس آلژینات در سویه‌های موکوئیدی، تشکیل بیوفیلم در این دسته از باکتریها تقویت شده و همین مسئله باعث افزایش قدرت مقاومت باکتری در برابر مواد ضد میکروبی ازجمله آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود. از نکات قابل توجه دیگر در مورد این باکتری مقاومت بسیار زیاد آن در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. به‌طوری که سویه‌های زیادی از این باکتری دارای مقاومت چندگانه هستند و به آنتی‌بیوتیک‌های متداول مقاوم شده‌اند. امروزه رویکرد جدیدی نسبت به گیاهان دارویی به منظور استفاده از آنها به‌عنوان مواد ضد میکروبی شده است، به‌طوری که مطالعات نشان داده است که برخی از مشتقات گیاهی می‌تواند سنتز پپتیدوگیکان را در باکتری متوقف کند (Ogunlana *et al.*, 1987) یا باعث آسیب به ساختمان غشایی میکروب‌ها شود (Cox *et al.*, 2000). تغییر در هیدروفوبیسیته غشاء سلولی و بهم‌زدن کوروم سنسینگ نیز به اثبات رسیده است (Turi *et al.*, 1997؛ Gao *et al.*, 2003). همه موارد ذکر شده می‌توانند در تشکیل بیوفیلم مؤثر باشند. بنابراین از این طریق تشکیل و توسعه بیوفیلم را می‌توانند تحت تأثیر قرار دهند (Morris & Monier, 2003). در واقع استفاده از غلظت‌های sub-MIC آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان یک راه حل پیشگیری به ابتلاء عفونتها معرفی شده است. به این ترتیب هدف از انجام این مطالعه، بررسی غلظت‌های sub-MIC اسانس‌های آویشن شیرازی، مورد و اکالیپتوس بر حرکت، اتصال، تولید آلژینات و تشکیل بیوفیلم در سویه موکوئیدی سودوموناس آئروجینوزا بود.

مواد و روشها

سویه باکتری

در این مطالعه از سویه موکوئیدی *P. aeruginosa* 8821M که توسط خانم ایزابل سا-کوریا (لیسبون-پرتغال) اهداء شده بود، استفاده گردید (Leitao *et al.*, 1992). سویه مذکور در محیط کشت اسکیم میلک (Difco Laboratories, Ditroit, MI) حاوی ۱۰٪

گلیسرول در ۸۰°C- نگهداری می‌شد و کشت مجدد آن بر روی محیط کشت مولر- هینتون آگار (Difco Laboratories, Ditroit, MI) انجام شد.

گیاهان و استخراج اسانس‌ها

گیاهان مورد مطالعه شامل آویشن شیرازی (*Zatarian mutiflora*)، مورد (*Myrtus communis*) و اکالیپتوس (*Eucalyptus camaldulensis*) بود که توسط بخش تحقیقات گیاهان دارویی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور جمع‌آوری و شناسایی شدند. گیاهان مذکور در سایه خشک شده و اسانس آنها به روش تقطیر با آب با استفاده از دستگاه کلونجر به مدت ۹۰ دقیقه استخراج شد. اسانس‌های استخراج شده به نسبت حجمی برابر در دی‌متیل‌سولفوکساید حل شدند و با استفاده از فیلتر ۰/٤٥ میکرومتری، سترون شدند. پس از سترون کردن، در ظروف شیشه‌ای سترون و تیره، در دمای ٤°C نگهداری شدند.

بررسی اثر ضد میکروبی

مقدار MIC اسانس‌های استخراج شده، به روش ماکروبراث دایلیوشن پیشنهاد شده توسط CLSI تعیین شد (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006). به‌طور خلاصه، دامنه رشد باکتری، با غلظت CFU/mL 10^5 در حضور غلظت‌های بین ۲٥٦-۰ µg/mL از اسانس در ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع مولر- هینتون براث مورد بررسی قرار گرفت. محیط‌های مذکور به مدت ۲٤ ساعت در ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شدند. حداقل غلظتی از اسانس که مانع از رشد باکتری شده بود، به‌عنوان MIC تعیین شدند. برای این منظور و تعیین صحیح مقدار MIC، پس از گرمخانه‌گذاری، از کلیه نمونه‌ها بر روی محیط کشت جامد مولر- هینتون آگار کشت شد تا از عدم افزایش تعداد باکتریها اطمینان حاصل شود. پس از تعیین MIC، از غلظت‌های ۰/٥MIC، ۰/۲٥MIC و ۰/۱۲٥MIC به‌عنوان غلظت‌های sub-MIC در قسمت‌های بعدی مطالعه استفاده شد. به عبارت دیگر چون در غلظت‌های sub-MIC عملاً اسانس بر روی رشد اثر ندارد، می‌توان اثر آن را روی فاکتورهای ویرولانس مورد مطالعه قرار داد. برای این منظور تعیین دقیق MIC، نکته بسیار مهم می‌باشد. به منظور اطمینان از نتیجه، این مرحله از آزمایش سه‌بار تکرار شد.

اثر اسانس‌ها بر اتصال باکتری

برای این منظور، باکتری در محیط کشت لوریا-برتانی (Difco Laboratories, Ditroit, MI)(LB) تلقیح و به مدت یک شب در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شد. در این مدت با دور ۱٥۰rpm شیکینگ می‌شد. محیط کشت‌های مذکور دارای غلظت‌های ۲MIC، ۰/٥MIC، ۰/۲٥MIC و ۰/۱۲٥MIC از اسانس‌ها بودند. از محیط کشت فاقد اسانس به‌عنوان کنترل استفاده شد. پس از مدت مذکور، باکتریها با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه جدا شده و ۲ بار در PBS با pH=۷/٤ شسته و به روش ذکر شده سانتریفیوژ شدند. در نهایت از باکتریهای شسته شده سوسپانسیونی با غلظت CFU/mL 10^7 در PBS تهیه شد. سپس از سوسپانسیون‌های تهیه شده مقدار ۲۰۰ میکرولیتر را در چاهک‌های پلیت‌های میکروتیتر ۹٦ چاهکی که حاوی ۱۸۰۰ میکرولیتر محیط LB حاوی غلظت‌های متفاوت sub-MIC اسانس‌ها بودند، اضافه شد. از محیط کشت

بدون اسانس نیز به‌عنوان شاهد استفاده شد. پس از تلقیح، پلیت‌های میکروتیتر را به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری کرده و پس از این مدت چاهک‌ها را خالی کرده و با استفاده از PBS شسته می‌شد تا باکتریهای آزاد و غیرمتصل حذف شوند. سپس پلیت‌های میکروتیتر در حالت واژگون قرار داده می‌شد تا کاملاً خشک شوند. پس از آن، مقدار ۲ میلی‌لیتر از محلول یک درصد سافرانین به مدت ۳۰ ثانیه به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد تا باکتریهای متصل رنگ‌آمیزی شوند. به منظور حذف رنگ‌های اضافی، مجدداً چاهک‌ها با استفاده از PBS شستشو شدند. پس از خشک‌کردن پلیت‌های میکروتیتر، مقدار ۲ میلی‌لیتر مخلوط استون- اتانل به نسبت حجمی برابر، به هر یک از پلیت‌ها اضافه شد. به این ترتیب رنگ‌های جذب شده توسط باکتریهای متصل، آزاد شد و مقدار جذب آن در A492 با استفاده از دستگاه الایزاریدر خوانده شد (O'Toole *et al*.,2007). تفاوت مقدار جذب در نمونه کنترل (فاقد اسانس) و آزمایش‌ها (دارای اسانس) بیانگر مقدار قدرت اتصال بود.

اثر اسانس‌ها بر حرکت

در بررسی اثر اسانس‌ها بر حرکت، دو نوع حرکت مورد سنجش قرار گرفت که عبارت بودند از سوئیمینگ و توئیچینگ. به منظور بررسی حرکت از نوع سوئیمینگ، پلیت حاوی یک درصد تریپتون (Difco Laboratories, Ditroit, MI)، ۰/۵ درصد NaCl و ۰/۳ درصد آگار (Difco Laboratories, Ditroit, MI) حاوی غلظت‌های sub-MIC اسانس‌ها تهیه شد. از محیط فاقد اسانس نیز به‌عنوان شاهد استفاده شد. سپس باکتری مورد نظر به صورت سوزنی در مرکز پلیت‌ها تلقیح شد. پلیت‌های تلقیح شده به مدت ۱۶ساعت در دمای ۲۵°C گرمخانه‌گذاری شدند. پس از این مدت، مقدار حرکت باکتریها در محیط کشت، از طریق اندازه‌گیری کدورت حلقوی هاله اطراف محل نقطه تلقیح با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شد (Fonseca *et al*., 2004). برای بررسی اثر اسانس‌ها بر حرکت توئیچینگ، از پلیت کشت حاوی LB یک درصد استفاده شد. در این روش نیز باکتری به صورت سوزنی تلقیح شد، با این تفاوت که نوک لوپ سوزنی به ته پتری‌دیش تماس پیدا می‌کرد. بعد از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰°C به مدت ۴۸ ساعت، به آرامی محیط کشت جامد از درون پتری‌دیش خالی شده و به آرامی با آب شیر شستشو می‌گردید. سپس ته پتری‌دیش با محلول کریستال ویوله یک درصد به مدت یک دقیقه رنگ‌آمیزی می‌شد. بدین صورت هاله حرکت باکتری در سطح پتری‌دیش که حاصل از حرکت از نوع توئیچینگ بود، رنگ می‌شد. با اندازه‌گیری مقدار قطر هاله، مقدار حرکت اندازه‌گیری و با نمونه کنترل مقایسه می‌شد (Fonseca *et al*., 2004).

اندازه‌گیری مقدار تولید آلژینات

برای اندازه‌گیری تولید آلژینات، به ارلن‌های حاوی ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع LB دارای غلظت‌های مختلف sub-MIC اسانس، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تازه باکتری با کدورت معادل ۰/۵ مک‌فارلند اضافه شد. از محیط کشت فاقد اسانس نیز به‌عنوان شاهد استفاده شد و پس از این مدت مقدار آلژینات تولید شده به روش Knutson اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، مقدار ۷۰ میکرولیتر از نمونه به ۶۰۰ میکرولیتر محلول اسید سولفوریک- اسید بوریک در حمام آب یخ اضافه شد.

پس از ٤ ثانیه مخلوط کردن، ۲۹ میکرولیتر از محلول ۰/۲ درصد کربازول در اتانل به آن اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب ۵۵°C قرار داده شد. پس از این مدت مقدار جذب با استفاده از اسپکتروفتومتری در ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Knutson & Jeanes 1968).

اندازه‌گیری مقدار تشکیل بیوفیلم

اندازه‌گیری تشکیل بیوفیلم به روش میکروپلیت انجام شد. روش انجام این آزمایش دقیقاً شبیه آزمایش اتصال بود. با این تفاوت که پس از اضافه کردن باکتریها به میکروپلیت‌های حاوی ۲mL محیط کشت LB حاوی غلظت‌های مختلف sub-MIC اسانس‌ها، دوره گرمخانه‌گذاری ١٦ ساعت بود و پس از این مدت، عمل رنگ‌آمیزی با سافرانین ۰/۰۲۵ درصد انجام شد. در این روش نیز هرچه بیوفیلم بیشتر تشکیل شده باشد، رنگ بیشتری به خود جذب می‌کند و مقدار جذب آن در دستگاه الایزاریدر نیز بیشتر است (O'Toole *et al*., 2007).

تجزیه و تحلیل آماری

هر یک از آزمایش‌های اتصال، حرکت، تولید آلژینات و تشکیل بیوفیلم، ٦ بار تکرار شد و نتایج حاصل شده در مقایسه با نمونه شاهد با استفاده از آزمون t مزدوج مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و معنادار بودن تفاوت با α=۰/۰۵ مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از تعیین MIC نشان داد که مقدار MIC برای هر سه اسانس معادل ٦٤µg/mL بود. بر این اساس مقادیر ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ آن به‌عنوان غلظت‌های sub-MIC به‌ترتیب ۳۲، ١٦ و ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد.

نتایج حاصل از بررسی اثر اسانس آویشن نشان داد که این اسانس در کلیه غلظت‌های sub-MIC بر روی اتصال، سوئیمینگ، توئیچینگ، تولید آلژینات و تشکیل بیوفیلم، اثر بازدارندگی دارد و نسبت به نمونه شاهد، تولید این عوامل بیماری‌زا، تفاوت آماری بارز داشت (جدول ۱). در مورد گیاه مورد، غلظت‌های ۰/۵MIC و ۰/۲۵MIC اثر بازدارندگی برای کلیه عوامل بیماری‌زایی مورد مطالعه دیده شد، اما در غلظت ۰/۱۲۵ این اثر فقط در توئیچینگ، تولید آلژینات و تشکیل بیوفیلم ملاحظه شد و تفاوت معناداری در عوامل بیماری‌زایی سوئیمینگ و اتصال نداشت (جدول ۱). بررسی نتایج حاصل از اثر اسانس اکالیپتوس نیز نشان داد که این اسانس نیز مانند دو اسانس قبلی اثر بازدارندگی معناداری نسبت به نمونه‌های شاهد در غلظت‌های ۰/۵MIC و ۰/۲۵MIC بر روی کلیه عوامل بیماری‌زای نامبرده داشت، اما در غلظت ۰/۱۲۵MIC فقط بر روی توئیچینگ اثر داشت و روی سایر عوامل ذکر شده فاقد اثر بارز نسبت به نمونه شاهد بود (جدول ۱).

بحث

حرکت، اتصال، تولید آلژینات و تشکیل بیوفیلم دارای نقش‌های متفاوتی در بیماری‌زایی سودوموناس ائروجینوزا هستند. متعاقب آن هر فرایندی که بتواند روی این عوامل اثر بگذارد، می‌تواند به درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری نیز کمک کند. این مسئله به ویژه در بحث پیشگیری و درمان بیماران با ضعف سیستم ایمنی حائز اهمیت است (Fonseca *et al*., 2004). مطالعات قبلی نشان داده است

جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف اسانس‌های آویشن شیرازی، مورد و اکالیپتوس بر سوئیمینگ، توئیچینگ، اتصال، تولید آلژینات و تشکیل بیوفیلم در سودوموناس آئروجینوزا 8821M

آزمایش	غلظت	اثر غلظت‌های مختلف اسانس		
		Z. multiflora	*M. communis*	*E. camaldulensis*
سوئیمینگ	۰/۵MIC	s	s	s
	۰/۲۵MIC	s	s	s
	۰/۱۲۵MIC	s	n	n
توئیچینگ	۰/۵MIC	s	s	s
	۰/۲۵MIC	s	s	s
	۰/۱۲۵MIC	s	s	s
اتصال	۰/۵MIC	s	s	s
	۰/۲۵MIC	s	s	s
	۰/۱۲۵MIC	s	n	n
تولید آلژینات	۰/۵MIC	s	s	s
	۰/۲۵MIC	s	s	s
	۰/۱۲۵MIC	s	s	s
تشکیل بیوفیلم	۰/۵MIC	s	s	s
	۰/۲۵MIC	s	s	s
	۰/۱۲۵MIC	s	s	n

s: دارای تفاوت معنادار نسبت به شاهد (significant)

n: فاقد تفاوت معنادار نسبت به شاهد (not significant)

MIC: حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد

از محیط‌های کشت بدون اسانس به‌عنوان شاهد استفاده شد.

که غلظت‌های sub-MIC جنتامیسین می‌تواند تولید آلژینات و پروتئازها را در شرایط آزمایشگاهی کاهش دهد (Behzadiyan-nejad *et al*., 1998). Fonseca و همکاران (۲۰۰۴) نشان داده‌اند که غلظت‌های sub-MIC پیپراسیلین/تازوباکتام اثرهای متفاوتی بر سویه‌های سودوموناس آئروجینوزا دارد. ازجمله این اثرها، تغییر در مرفولوژی و هیدروفوبیسیته است که منجر به کاهش شدید اتصال و تشکیل بیوفیلم می‌شود. همچنین ایشان نشان داده‌اند که حرکت به واسطه سوئیمینگ و توئیچینگ در غلظت‌های sub-MIC پیپراسیلین/تازوباکتام کاهش می‌یابد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، مطالعات اخیر با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها (جنتامیسین، پیپراسیلین/تازوباکتام) صورت گرفته است و گزارش معدودی از اثر اسانس‌ها در غلظت‌های sub-MIC بر روی این باکتری وجود دارد.

ازجمله مطالعات صورت‌گرفته می‌توان به مطالعه Owlia و همکاران (۲۰۰۷) بر روی اثر غلظت‌های

sub-MIC اسانس بابونه به تولید بیوفیلم در سودوموناس آئروجینوزا اشاره کرد. در این مطالعه نشان داده شده است که برخی از غلظت‌های sub-MIC بابونه می‌تواند تولید آلژینات و بیوفیلم را در باکتری مورد نظر کاهش دهد. نتایج این مطالعه نزدیکی زیادی با نتایج حاصل از مطالعه حاضر دارد و حتی روشهای بکار رفته نیز یکسان می‌باشد. از آنجا که تولید و استفاده از داروهای گیاهی ارزان‌تر و امن‌تر می‌باشد، می‌توان گفت که نتایج این مطالعه نسبت به مطالعات ذکر شده می‌تواند بالقوه ارزش خاصی داشته باشد.

هر چند مطالعات بسیار زیادی بر روی اثرهای ضد باکتریایی اسانس‌های گیاهی صورت گرفته است، اما تمرکز بر اثربخشی این موارد در غلظت‌های پایین‌تر از حداقل غلظت بازدارندگی رشد، امری ضروری به نظر می‌رسد و در مطالعه حاضر، مشخص شده است که در برخی از غلظت‌های sub-MIC اسانس‌های اشاره شده، تولید برخی از عوامل بیماری‌زایی، تحت تأثیر قرارگرفته و کاهش بارزی نسبت به نمونه‌های شاهد پیدا می‌کند. مسلماً ترکیب های شیمیایی تشکیل‌دهنده این اسانس‌ها اثر مهمی در این اثربخشی دارند و آنالیز این ترکیب ها در ادامه مطالعه امری ضروری می‌باشد. هر چند معمولاً این اثرها نمی‌توانند تنها حاصل از یک ترکیب خاص باشد، اما بررسی تک‌تک این ترکیب ها و یا بررسی توأم این ترکیب‌ها می‌تواند کمک مؤثری در دستیابی به داروهای گیاهی داشته باشد. نکته جالب توجه دیگر این است که هر چند با مطالعات اخیر مکانیزم اثر ضد میکروبی اسانس‌های مذکور تا حدودی مشخص شده است، اما تعمیم سازوکار ملکولی این اثربخشی می‌تواند افقی جدید در پیش رو ایجاد کند. برای نیل به این هدف انجام مطالعات وسیعتر امری ضروری و اجتناب‌ناپذیر است. در مجموع، می‌توان گفت که با مطالعه بیشتر می‌توان از گیاهان اشاره شده به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده کرد، اما این امر نیاز به مطالعه بیشتر دارد. اهمیت این موضوع بدین لحاظ است که افزایش روزافزون مقاومت در باکتری سودوموناس آئرجینوزا، سبب شده است که با مشکل درمان عفونتهای ناشی از آن مواجه شویم و این مطالعات امکان دستیابی به فرآورده‌های جدید را به‌عنوان جایگزین میسر می‌کند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مسئولان محترم دانشگاه شاهد که در تأمین بودجه و امکانات لازم برای انجام این پروژه مساعدت لازم را داشته‌اند، تشکر بعمل می‌آید. همچنین از بخش تحقیقات گیاهان دارویی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور نیز که در تهیه گیاهان و اسانس‌ها همکاری داشته‌اند، قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

- Behzadiyan-nejad, Q., Souri, E. and Owlia, P., 1998. In-vitro effects of sub-inhibitory concentrations of gentamicin on *P. aeruginosa* alginate production. Pharmacy and Pharmacology Communication, 4: 489- 491.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. Seventh Edition. CLSI document M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 1-64.
- Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E. and Warmington, J.R., 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Journal of Applied Microbiology, 88: 170-175.
- Demko, C.A., 1980. Thomassen M.G. Effect of mucoid property on antibiotic susceptibility of

bacteria. Annual Review of Phytopathology, 41: 429-453.
- Ogunlana, E.O., Hoeglund, S., Onawunmi, G. and Skoeld, O., 1987. Effects of lemongrass oil on the morphological characteristics and peptidoglycan synthesis of Escherichia coli cells. Microbios, 50: 43-59.
- O'Toole, G.A., Pratt, L.A., Watnick, P.I., Newman, D.K., Weaver, V.B. and Kolter R., 2007. Genetic approaches to study of biofilms. Methods in Enzymology, 310: 91-105.
- Owlia, P., Rasooli, I., Saderi, H. and Aliahmadi, M., 2007. Retardation of biofilm formation with reduced productivity of alginate as a result of *Pseudomonas aeruginosa* exposure to *Matricaria chamomilla* essential oil. Pharmacognosy Magazin, 3: 83-89.
- Slack, M.P. and Nichols, W.W., 1981. The penetration of antibiotics through sodium alginate and through the exopolysaccharide of a mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Lancet, 2: 5020-5023.
- Tateda, K., Hirakata, Y., Furuya, N., Ohno, A. and Yamaguchi, K., 1993. Effects of sub-MICs of erythromycin and other macrolide antibiotics on serum sensitivity of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 37: 675-680.
- Turi, M., Turi, E., Koljalg, S. and Mikelsaar, M., 1997. Influence of aqueous extracts of medicinal plants on surface hydrophobicity of Escherichia coli strains of different origin. Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica, 105: 956-962.
- Van Delden, C. and. Iglewski, B.H., 1998. Cell-to-cell signaling and Pseudomonas aeruginosa infections. Emerging Infectious Diseases, 4: 551-460.
- Wilson, J.W., Schurr, M.J., LeBlanc, C.L., Ramamurthy, R., Buchanan, K.L. and Nickerson, C.A., 2002. Mechanisms of bacterial pathogenicity. Journal of Postgraduate Medicine, 78: 216-224.

Pseudomonas aeruginosa. Current Microbiology, 4: 69-73.
- Drago, L., De Vecchi, E., Mombelli, B., Nicola, L., Valli, M. and Gismondo, M.R., 2001. Activity of levofloxacin and ciprofloxacin against urinary pathogens. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48: 37-45.
- Fonseca, A.P., Extremina, C., Fonseca, A.F. and Sousa, J.C., 2004. Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on Pseudomonas aeruginosa. Journal of Medical Microbiology, 53: 903-910.
- Gao, M., Teplitski, M., Robinson, J.B. and Bauer. W.D., 2003. Production of substances by Medicago truncatula that affect bacterial quorum sensing. Molecullar Plant-Microbe Interaction, 16: 827-834.
- Hassett, D.J., Elkins, J.G., Ma, J.F. and McDermott, T.R., 1999. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm sensitivity to biocides: use of hydrogen peroxide as model antimicrobial agent for examining resistance mechanisms. Methods in Enzymology, 310: 599-608.
- Horii, T., Morita, M., Muramatsu, H., Muranaka,Y., Kanno, T. and Maekawa, M., 2003. Effects of mupirocin at subinhibitory concentrations on flagella formation in Pseudomonas aeruginosa and Proteus mirabilis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 51: 1175-1179.
- Knutson, C.A. and Jeanes, A., 1968. A new modification of the carbazole analysis: application to heteropolysaccharides. Annals of Biochemistry, 24: 470-481.
- Leitao, J.H., Fialho, H. and Sa-Correia, I., 1992. Effects of growth temperature on alginate synthesis and enzymes in Pseudomonas aeruginosa variant. Journal of General Microbiology, 38: 605-610.
- Morris, C.E. and Monier, J.M., 2003. The ecological significance of biofilm formation by plantassociated

The effects of sub-inhibitory concentrations of some essential oils on adherence, motility, alginate production and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*

L. Moein Najafabadi[1], P. Owlia[2*], S. Mousavi Nadoushan[1], I. Rasooli[3], H. Saderi[4], F. Sefidkon[5] and M.H. Salari[6]

1- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran
2*- Corresponding author, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran, E-mail: owlia@shahed.ac.ir
3- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran
4- Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran
5- Department of Medicinal Plant Research, Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran, Iran
6- Department of Bacteriology, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: September 2009 Revised: November 2009 Accepted: November 2009

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is an important opportunistic pathogen with many virulence factors. In this study, the effects of sub-MICs of three essential oils on alginate production, biofilm formation, swimming, twitching and adhesion in *P. aeruginosa* have been evaluated. The plants (*Zataria multiflora* Boiss., *Myrtus communis* L. and *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.) were dried in shadow and were hydro-distilled for 90 minutes. Minimal inhibitory concentrations (MIC) of essential oils were determined by macrodilution method. The virulence factors in the mucoid *P. aeruginosa* 8821M were determined in the presence of sub-MICs (1/2, 1/4 and 1/8) of essential oils. The MICs of essential oils against *P. aeruginosa* for *Z. multiflora, M. communis* and *E. camaldulensis* oils were obtained 64, 64 and 64µg/mL, respectively. The results showed that all oils at 1/2 and 1/4 MICs significantly reduced all tested virulence factors. At 1/8 MICs, *Z. multiflora* oil had significantly reduced virulence factors, but another oils had different effects. This study showed that sub-MIC levels of *Z. multiflora, M. communis* and *E. camaldulensis* essential oils affected alginate production, biofilm formation, swimming, twitching and adhesion in *P. aeruginosa* and it is probable to use these medicinal plants for treating.

Key words: Motility, alginate, biofilm, essential oil, *Pseudomonas aeruginosa.*